

Des ribozymes à la demande

La découverte des ribozymes, et les perspectives qu'elle révèle quant au « monde de l'ARN », est bien décidément un des faits scientifiques majeurs des dernières années (*m/s* n° 2, vol. 1, p. 107, et suppl. au n° 7, vol. 7, p. 30).

Une équipe australienne de Canberra vient maintenant d'élucider certaines règles fondamentales définissant les ARN à activité catalytique (endonucléasique) et leur cible ([1] et figure 1). Le point de départ de leurs travaux a consisté à isoler l'une de l'autre des régions d'un ARN autocatalytique de plante, l'une étant responsable de l'activité catalytique et l'autre fournissant le site « substrat » pour la coupure endoribonucléasique.

L'ARN d'un virus de tabac (mais aussi d'autres virus auxiliaires ou de viroïdes) se réplique pour donner des enchaînements (concatémères) de l'unité de transcription qui doivent être secondairement clivés pour libérer les unités indépendantes.

La réaction est autocatalytique, se fait à pH neutre ou légèrement alcalin en présence de cations divalents. Elle engendre des extrémités 5' hydroxyles et 2'-3' phosphate cycliques.

Il est possible, en combinant diverses expériences de mutagenèse dirigée et de sous-clonages de fragments d'ADN complémentaires de l'ARN viral, d'obtenir des oligonucléotides de respectivement 19 et 24 bases dont les copies ARN possèdent les activités catalytiques (ARN de 19 bases) et de substrat (ARN de 24 bases).

La comparaison entre la structure de ces oligonucléotides et celles de sites correspondants d'autres ARN qui subissent une réaction d'auto-clivage a permis aux auteurs de prédire les caractéristiques essentielles conférant à un ARN, d'une part la propriété catalytique de cliver un autre ARN,

d'autre part d'être substrat de cette réaction.

La figure 1 montre que le clivage survient en 3' d'un triplet GUC ou d'une séquence apparentée. Cela constitue la seule similitude de séquence entre différents sites de clivage.

L'ARN ribozymatique a une structure conservée comportant deux boucles, l'une étant fermée par une tige appariée. La continuité de la boucle ne serait d'ailleurs pas nécessaire à l'activité.

De plus, des séquences d'ARN de part et d'autre du site de clivage

sur le brin substrat et du motif ribozymatique sur le brin catalytique sont étroitement complémentaires.

Afin de tester ce modèle, Jim Hasehoff et Wayne L. Gerlach ont synthétisé des ribozymes conçus pour cliver un ARN procaryotique : le motif ribozymatique a donc été entouré de séquences complémentaires des bases situées de part et d'autre de triplets GUC sur l'ARN à cliver.

Les ARN transcrits *in vitro* à partir de constructions ADN codant pour ces caractéristiques se révèlent avoir en effet une action catalytique d'endoribonucléase spécifique de site : ils

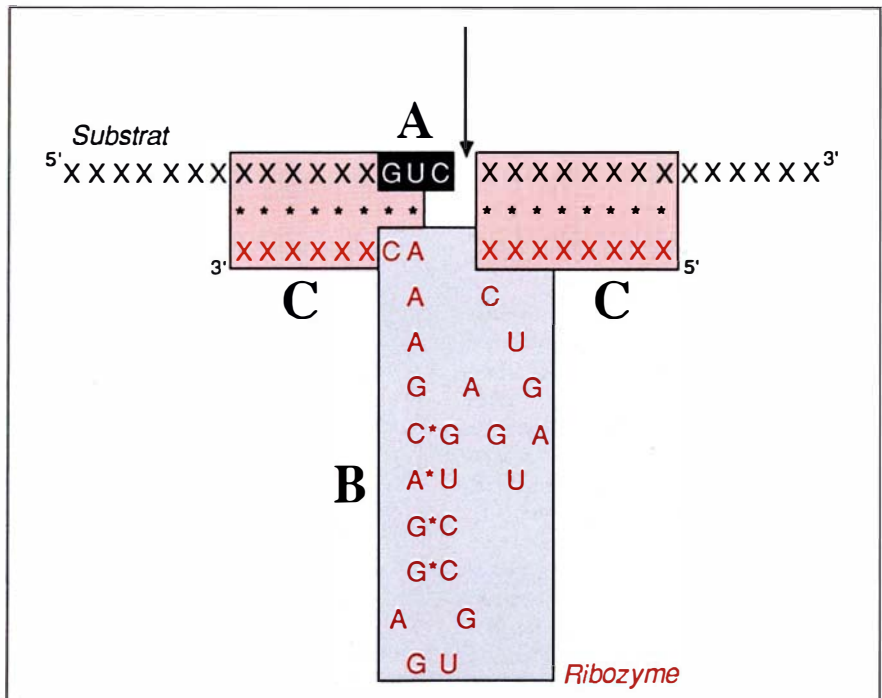


Figure 1. **Modèle d'un ribozyme et de son substrat.** L'ARN substrat est représenté en noir, avec en lettres blanches dans un rectangle noir (motif A) le triplet conservé GUC en 3' duquel se fait le clivage. L'ARN ribozymatique est représenté en rouge. Le rectangle gris (motif B) délimite le motif conservé du ribozyme, formant probablement son centre actif. Les rectangles roses (motif C) délimitent les zones appariées entre les ARN substrat et catalytique. Les astérisques indiquent les paires de bases appariées (d'après [1]).

digèrent en une heure à 50° C un excès molaire d'ARN substrat d'environ 10 fois.

Le mécanisme catalytique précis reste inconnu ; il pourrait s'agir de la déprotonation (déplacement d'un proton) d'un radical 2' hydroxyle exposé qui réagirait à son tour par attaque nucléophile du phosphate appartenant au pont phosphodiester le plus proche, aboutissant donc à un clivage engendrant une extrémité 5' OH libre du fragment adjacent et une extrémité cyclique 2'-3' phosphate du fragment portant le triplet GUC.

Le « centre catalytique » du ribozyme pourrait être constitué par des métaux divalents précisément complexés au site actif ribozymatique, ou bien par des groupes actifs de l'ARN lui-même.

Quoiqu'il en soit, cette découverte doit être considérée comme tout à fait essentielle. Elle généralise les notions acquises ces dernières années sur la catalyse par l'ARN (« ribozymatique »). Elle ouvre la voie à la biotechnologie de l'ARN, les ribozymes ainsi synthétisés pouvant être considérés comme les premières enzymes de restriction de l'ARN (un « ribozyme de restriction », en quelque sorte). Elle suggère enfin une nouvelle voie pour réaliser des « phénocopies » d'altération génique que les ARN antisens permettent rarement d'obtenir chez la souris : un transgène transcrit en un « ribozyme de restriction » spécifique du messenger d'un gène dont on désire supprimer les effets pourrait peut-être, du fait du potentiel catalytique du ribozyme (dont une molécule a le potentiel d'en digérer un grand nombre), aboutir à la destruction totale du messenger cible. Puisque la science consiste aussi à rêver au possible, sinon au probable, l'on peut aussi imaginer que les ribozymes se révéleront demain de redoutables agents antiviraux, inhibant l'expression des gènes de virus à ADN ou de provirus, voire clivant les formes répliquatives des virus à ARN.

A. K.

Haseloff J, Gerlach WL. Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature* 1988 ; 334 : 585-91.

m/s n° 8 vol. 4, octobre 88

■■■ Contrôle de la transcription des gènes de mammifères par l'AMP cyclique. Beaucoup de questions soulevées dans une nouvelle parue il y a plus de deux ans dans *m/s* (n° 5, vol. 2, p. 284) et consacrée à l'action de l'AMP cyclique sur les gènes animaux sont maintenant résolues grâce aux travaux de l'équipe du Pr M.R. Montminy (Salk Institute, La Jolla, Californie, USA). La protéine (peut-être une des protéines) reconnaissant, au niveau des promoteurs de gènes, l'élément d'ADN CRE (*cyclic-AMP response element*) responsable de l'activation transcriptionnelle par l'AMPc a été purifiée ; elle est dénommée CREB (*CRE binding protein*) ; son poids moléculaire est de 43 000 [1]. La séquence CRE est habituellement « palindromique » (*m/s* n° 7, vol. 3, p. 428), ce qui suggère qu'elle peut fixer un dimère protéique. La protéine CREB peut être phosphorylée sous l'influence de la protéine kinase C (PK-C) et de la protéine kinase stimulée par l'AMPc (PK-A). La PK-C favorise la dimérisation de CREB, la PK-A étant sans action sur ce paramètre. La déphosphorylation de la protéine (par de la phosphatase alcaline) favorise au contraire sa dissociation en monomères. La PK-A augmente au moins 20 fois l'activité « transcriptionnelle » de CREB, la PK-C n'ayant pas été testée pour des raisons techniques. Ainsi peut-on proposer le schéma suivant : la PK-C (et ses stimulateurs comme les esters de phorbol) phosphorylerait la CREB sur un site favorisant la dimérisation de la protéine, augmentant ainsi très probablement son affinité pour la séquence CRE. La PK-A phosphorylerait la protéine sur un autre site, le résultat n'étant pas une modification de l'affinité pour l'ADN mais une augmentation du pouvoir stimulant de CREB sur la transcription d'un promoteur voisin.

[Yamamoto KK, *et al. Nature* 1988 ; 334 ; 494-8.]

■■■ Toutes les protéines à zinc ne sont pas des « protéines dactyles ».

Les protéines pouvant adopter une configuration en doigts stabilisés par un atome de zinc échangeant des liaisons de coordination avec des cystéines et (éventuellement) des histidines, ont actuellement une énorme popularité (pour la description des protéines dactyles et de leur interaction avec l'ADN, voir *mini-synthèse m/s* n° 7, vol. 3, p. 428). Il semble qu'il n'y ait guère de facteur de transcription ou de gène de développement décrits ces mois-ci dont on ne rapporte qu'ils sont des protéines à doigts. Les exemples les plus récents concernent le facteur TDF de détermination du sexe (*m/s* n° 3, vol. 4, p. 188) et le gène dont la modification prédisposerait au rétinoblastome (*m/s* n° 6, vol. 3, p. 363). De là découlent deux généralisations abusives : identifier les protéines à zinc à des protéines à doigts... et les protéines à doigts à des facteurs de transcription. Un récent article rapporte que la protéine Tat, produit du gène *tat* d'HIV-1, lie le zinc (ou le cadmium), la forme liée à un métal tendant à se dimériser [1]. Quoique les atomes métalliques semblent se lier au niveau d'une région riche en cystéines, rien n'indique dans la structure de la protéine Tat que celle-ci puisse posséder des doigts. La protéine Tat est le transactivateur du virus HIV, fonctionnant probablement comme un anti-terminateur de la transcription au niveau de la séquence TAR du LTR viral [2]. Si la dimérisation induite par le zinc est fonctionnellement importante, une nouvelle voie de recherche thérapeutique contre le SIDA pourrait être constituée par des chélateurs des métaux divalents ou par des analogues peptidiques du site de fixation du zinc sur la sous-unité Tat.

[1. Frankel AD, *et al. Science* 1988 ; 240 : 70-3]

[2. Kao SY, *et al. Nature* 1987 ; 330 : 489-91]

■■■ **Un nouveau gène « différenciateur » spécifique de la lignée myogénique.** Nous avons récemment rapporté dans *médecine/sciences* le clonage moléculaire d'un ADN capable d'induire la différenciation myogénique de cellules d'origine mésodermique dans lesquelles il était exprimé [1]. Le gène correspondant a été appelé *MyoD*. Une autre équipe des États-Unis (Charlottesville, Virginie) vient de mettre en évidence un nouveau gène dont l'expression aboutirait également à la différenciation de cellules fibroblastiques en myotubes [2]. La méthode utilisée a été de transférer des cellules fibroblastiques murines ayant une propension naturelle à se différencier en cellules myogéniques lors de certains traitements (par la 5 azacytidine, par exemple, agent entraînant une déméthylation de l'ADN) par des cosmides contenant de grands fragments d'ADN humains. Certaines des cellules transfectées se développent en clones myogéniques dont l'ADN peut être à nouveau utilisé pour obtenir des « transfectants secondaires ». Ceux-ci semblent contenir un seul type d'ADN humain, supposé contenir le gène *myd* dont l'expression suffirait à induire la différenciation myogénique des fibroblastes murins transfectés. Ce gène *myd* pourrait être normalement activé par déméthylation, provoquée par le traitement des fibroblastes par la 5 azacytidine ou par le passage (pour le clonage) des cosmides contenant les fragments d'ADN dans des bactéries dépourvues des systèmes spécifiques de méthylation. Les clones myogéniques contenant le gène *myd* activé expriment aussi le messager *MyoD*, ainsi que d'autres marqueurs spécifiques de la différenciation musculaire. On peut donc supposer qu'il existe une hiérarchie des gènes différenciateurs *myd*, activé par déméthylation, stimulant l'expression d'autres gènes intervenant dans la différenciation myogénique.

- [1. Davis RL, *et al. Cell* 1987 ; 51 : 987-1000.]
 [2. Pinney DF, *et al. Cell* 1988 ; 53 : 781-93].

■■■ **Controverse à propos du rôle de l'amplification de l'oncogène *neu* (ou *c-erbB-2*) dans le pronostic du cancer mammaire.** Slamon *et al.* rapportaient, en 1987, que l'amplification de l'oncogène *neu* (plus fréquemment appelé maintenant *c-erbB-2*) permettrait de définir un sous-groupe de cancers du sein affectés d'un mauvais pronostic [1]. Un groupe franco-américain (NIH, Bethesda, Maryland, USA et Centre René Huguenin, Saint-Cloud) vient de publier des chiffres contestant cette donnée [2]. Il apparaît, à la lecture de ces différents articles, que, le cancer du sein étant une affection hétérogène dont « l'histoire naturelle » peut être différente selon les régions, il importe d'être extrêmement prudent avant que de généraliser à partir des données d'un seul groupe [3].

- [1. Slamon DJ, *et al. Science* 1987 ; 235 : 177-80.]
 [2. Ali IU, *et al. Science* 1988 ; 240 : 1795-6.]
 [3. Slamon DJ, Clark GM. *Science* 1988 ; 240 : 1796-8.]

■■■ **De nouvelles voies apparaissent pour le développement de la vaccination antimalarique.** Un antigène de 41 000 daltons, exprimé à la surface des hématies impaludées et constituant une cible importante d'anticorps protecteurs, a été caractérisé par une équipe de la firme Hoffman La Roche de Bâle et par une autre équipe de Genève [1]. Il s'agit en fait de l'enzyme glycolytique aldolase, catalysant l'hydrolyse du fructose 1-6 bisphosphate en trioses phosphates. La dégradation du glucose par la voie de la glycolyse est la principale source d'énergie du parasite, si bien que l'inhibition de l'activité glycolytique pourrait empêcher son développement. De plus, l'aldolase parasitaire est conservée dans les différentes souches, ce qui devrait élargir le spectre utile d'un éventuel vaccin. Par ailleurs, une équipe de Washington (en collaboration avec les laboratoires Smith Kline et French), a montré sur un modèle de souris qu'il était possible de conférer une immunité contre les formes hépatiques du *Plasmodium* grâce à l'ingestion de souches atténuées de *Salmonella typhimu-*

rium génétiquement recombinaées par intégration d'un gène codant pour un antigène parasitaire [2]. Une telle possibilité de vaccination par voie orale apparaîtrait bien adaptée aux conditions sanitaires de la plupart des pays impaludés. Elle devrait, en toute éventualité, être associée à l'immunisation contre des antigènes d'un autre stade du cycle parasitaire, par exemple les enzymes des formes érythrocytaires [3].

- [1. Certa U, *et al. Science* 1988 ; 240 : 1036-8.]
 [2. Sadoff J, *et al. Science* 1988 ; 240 : 336-8.]
 [3. Cox FEJ. *Nature* 1988 ; 333 : 702.]

■■■ **Les effets moléculaires des anesthésiques généraux, en particulier volatiles, restent largement mystérieux.** Il est probable qu'ils pourraient entraîner une hyperpolarisation neuronale — dont l'existence est évidente durant l'anesthésie — par une action sur des courants membranaires, notamment potassiques. Franks et Lieb [1] ont étudié les effets de concentrations habituelles de divers anesthésiques volatiles sur les canaux K^+ de cellules chez un mollusque d'eau douce. Parmi quelques dizaines de neurones de l'un des ganglions de ce mollusque, un s'est montré hautement sensible à ces concentrations d'anesthésiques. En poussant plus loin l'analyse, les auteurs ont mis en évidence que l'hyperpolarisation observée sur ce neurone était liée à un courant sortant potassique dépendant d'un canal K^+ . Les caractéristiques de ce canal sont tout à fait originales par rapport aux canaux K^+ que l'on connaît, et le courant sortant persiste tant que l'anesthésique est présent. L'activation d'un courant K^+ persistant pourrait effectivement entraîner une diminution généralisée de l'excitabilité neuronale comparable à celle observée sous anesthésie dans diverses structures cérébrales chez le mammifère. Il reste à démontrer, toutefois, qu'un tel canal K^+ — « anesthésique-dépendant » existe bien chez d'autres espèces que ce mollusque d'eau douce.

- [1. Franks NP, Lieb WR. *Nature*, 1988 ; 662-4.]

■■■ **Un nouveau locus génétique pour la polykystose rénale autosomique dominante (ADPKR).** Le gène de l'ADPKR a été localisé en 1985 sur le bras court du chromosome 16, à l'aide de sondes liées au gène de l' α -globine. Dans deux familles atteintes, d'origine italienne, aucune liaison n'a été observée avec les différentes sondes disponibles situées à proximité du gène de l' α -globine. Dans ces familles, la maladie rénale n'a pas de particularité. Il existerait donc deux ADPKR apparemment identiques, mais dont la pathologie moléculaire serait différente: l'une liée au gène de l' α -globine, en situation proximale par rapport à ce gène, sur le chromosome 16; l'autre dont le gène mutant ne serait pas situé dans la région étudiée, et pourrait être localisé soit dans une autre région du chromosome 16, soit sur un autre chromosome.

[Romeo G, et al. *Lancet* 1988; 2: 8-11].

■■■ **Des neurones qui naissent à l'âge adulte.** C'est surprenant, mais quand, de plus, ces neurones contrôlent le chant chez les canaris, un brin de poésie entre dans la neurobiologie. La loi qui veut que, dans l'ensemble des espèces, les neurones ne se multiplient plus après la naissance est en effet bafouée chez les canaris et chez des espèces proches d'oiseaux chanteurs. Au cours de l'apprentissage du chant, qui se poursuit largement chez certaines de ces espèces durant l'âge adulte, une neurogenèse active se poursuit dans l'hyperstriatum ventral, une zone indirectement liée au chant. On pensait jusqu'à présent que ces « nouveaux » neurones avaient une influence locale et qu'ils modulaient l'activité des circuits existants. Dans un travail récent [1], les zones de projection de ces « nouveaux » neurones ont été étudiées chez un de ces oiseaux chanteurs à l'aide de traceurs axonaux et on s'est aperçu que la moitié d'entre eux projettent en fait en dehors de l'hyperstriatum, sur les structures

qui commandent directement les motoneurones impliqués dans la vocalisation. Les produits de cette neurogenèse chez l'adulte sont donc partie intégrante des systèmes spécifiques impliqués dans le chant. On n'a pas prouvé jusqu'à présent que cette neurogenèse était directement liée à l'apprentissage du chant, mais il existe de fortes présomptions car elle est, notamment, beaucoup plus importante chez le mâle, qui est chanteur, que chez la femelle qui ne l'est pas. Quant à l'incapacité à chanter juste, largement répandue chez nos congénères, l'arrêt complet de la neurogenèse chez l'homme dès la prime enfance l'explique peut-être! [1. Nordeen KW, Nordeen EJ. *Nature* 1988; 334: 149-51.]

■■■ **Gènes de segmentation chez les mammifères.** Chez la drosophile, de nombreux gènes de segmentation ont été caractérisés et leur séquence a été déterminée. Ils interviennent, au cours du développement, après les gènes (à effet maternel) qui déterminent la polarité de l'embryon, et avant les gènes homéotiques qui contrôlent la différenciation de segments particuliers. Chez les mammifères, la conservation d'un élément des gènes homéotiques dans les espèces (*l'homeobox*) a permis de cloner et d'étudier l'expression de nombreux gènes homéotiques qui, comme on pouvait s'y attendre, s'expriment dans des structures particulières de l'embryon au cours du développement. Très récemment, U. Deutsch, de l'équipe de Peter Gruss à Göttingen (RFA), est parvenu à cloner l'équivalent murin d'un gène de segmentation de la drosophile (*gooseberry distal*) [1]. Dénommé *Pax 1*, ce gène est le premier qui, chez les mammifères, pourrait intervenir de fait dans un processus de segmentation, la formation des somites, d'où dériveront les vertèbres, les masses musculaires et la peau. La détection du messenger *Pax 1* par hybridation *in situ* sur coupes d'embryons de souris révèle en effet

une expression en bandes alternées, tout au long de l'axe rostrocaudal, tout comme cela est noté pour les gènes de segmentation de la drosophile.

[1. Deutsch U, et al. *Cell* 1988; 53: 617-25.]

■■■ **Phénocopie d'une maladie chez un mammifère par utilisation d'ARN anti-sens: un premier succès.** L'inhibition de l'expression d'un gène grâce à l'utilisation d'ARN anti-sens est une méthode en laquelle de nombreux espoirs ont été fondés et qui a, de fait, donné des résultats sur des modèles cellulaires et chez la drosophile. Chez les mammifères, cependant, il a été jusqu'à présent impossible de créer des lignées transgéniques constituant des copies phénotypiques d'une mutation grâce à l'expression d'un transgène anti-sens (*m/s n° 5, vol 3, p. 299*). Un premier succès vient d'être obtenu chez des souris transgéniques exprimant un ARN anti-sens correspondant au messenger de la protéine basique de la myéline (PBM) [1]. Comme les mutants *shiverer* dont les deux gènes codants sont mutés (*m/s n° 6, vol 3, p. 359*), les souris transgéniques d'une lignée ont des tremblements apparaissant après la naissance et s'aggravant progressivement. L'examen histologique retrouve les anomalies de myélinisation caractéristiques des mutants *shiverer*. L'obtention de phénocopies de la maladie est probablement facilitée, ici, par la non nécessité d'une absence totale d'expression des gènes PBM pour qu'apparaissent les symptômes [2]. Les animaux transgéniques, phénocopies de la mutation *shiverer*, n'ont qu'une diminution partielle (50 à 80%) du messenger codant pour la PBM. Il se pourrait de plus que, du fait de la présence de l'anti-messenger, l'ARNm PBM fût mal traduit.

[1. Katsuki M, et al. *Science* 1988; 241: 593-595.]

[2. Popko B, et al. *Cell* 1987; 48: 13-21.]